

Sección: Artículos de investigación

Evaluación de la actividad antiulcerogénica de *Atriplex undulata* D. Dietr. sobre estómagos de ratones bajo estrés y administrados con indometacina

Artículo de Toso F, Ardoino SM, Hartfiel L, Herpsommer M, Alvarez HL, Benitez VP, Toso RE

CIENCIA VETERINARIA, Vol. 22, N° 1, enero-junio de 2020, ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea), pp. 13-22.

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-202022101>

Evaluación de la actividad antiulcerogénica de *Atriplex undulata* D. Dietr. sobre estómagos de ratones bajo estrés y administrados con indometacina

Toso F.¹, Ardoino SM.², Hartfiel L.², Herpsommer M.², Alvarez HL.², Benitez VP.², Toso RE.²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 esq. 116 General Pico (6360) La Pampa. Argentina.

²Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF). Calle 5 esq. 116. General Pico, La Pampa. (6360) Argentina.

Correo electrónico: retoso@vet.unlpam.edu.ar

RESUMEN

Los pacientes hospitalizados que sufren procesos inflamatorios acompañados de dolor, frecuentemente son administrados con AINEs y también, en forma profiláctica, con antiseoretos gástricos. Estos, reducen sensiblemente las lesiones gástricas, pero también producen efectos secundarios. Teniendo como objetivo buscar compuestos que reemplacen el uso de estos protectores gástricos, en este trabajo se evaluó la actividad antiulcerogénica de extractos hidroalcohólicos de *Atriplex undulata*. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando cuatro grupos de ratones: el Grupo Control (GC) y el Grupo Control Tratado (GTZ) fueron sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización, los ratones pertenecientes a los Grupos Control Indometacina (GCI) y al Grupo Control Indometacina Tratado (GTZI) fueron sometidos a estrés y también fueron administrados con indometacina. Los GTZ y GTZI recibieron respectivamente una dosis vía oral de extracto hidroalcohólico proveniente de 0,5 g de planta desecada, resuspendida en carboximetilcelulosa. El daño gástrico fue evaluado midiendo el área ulcerada con un analizador de imágenes y comparando el GC respecto al GTZ y el GCI respecto al GTZI. En ambos casos, el extracto hidroalcohólico previno en forma significativa ($p \leq 0,05$) la formación de



úlceras. Estos resultados permitieron concluir que el extracto hidroalcohólico de *Atriplex undulata* reduce significativamente en ratones la formación de úlceras por estrés y también las inducidas por estrés y administrados al mismo tiempo con indometacina. En estudios próximos, se realizarán ensayos clínicos para evaluar el potencial uso de fármacos elaborados a partir de *Atriplex undulata* como protectores gástricos durante tratamientos prolongados con AINEs en animales sometidos a estrés.

Palabras clave: Gastroprotector, *Atriplex undulata*, AINEs, Antiulcerogénico

Evaluation of the antiulcerogenic activity of Atriplex undulata D. Dietr. on stomachs of mice under stress and administered with indomethacin

ABSTRACT

Hospitalized patients suffering from inflammatory processes accompanied by pain are frequently administered with NSAIDs and also, prophylactically, with gastric antisecretors. These significantly reduce gastric lesions, but also produce side effects. With the objective of looking for compounds that replace the use of these gastric protectors, in this work the antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extracts of *Atriplex undulata* was evaluated. The tests were carried out using four groups of mice: the Control Group (GC) and the Controlled Control Group (GTZ) were subjected to stress due to hypothermia and immobilization, the mice belonging to the Indomethacin Control Groups (GCI) and the Control Group Treated Indomethacin (GTZI) were subjected to stress and were also administered with indomethacin. The GTZ and GTZI respectively received an oral dose of hydroalcoholic extract from 0.5 g of dried plant, resuspended in carboxymethyl cellulose. Gastric damage was assessed by measuring the ulcerated area with an image analyzer and comparing the GC with respect to the GTZ and the GCI with respect to the GTZI. In both cases, the hydroalcoholic extract significantly prevented ($p \leq 0.05$) the formation of ulcers. These results allowed us to conclude that the hydroalcoholic extract of *Atriplex undulata* significantly reduces the formation of stress ulcers in mice and also those induced by stress and administered at the same time with indomethacin. In future studies, clinical trials will be conducted to evaluate the potential use of drugs made from *Atriplex undulata* as gastric protectors during prolonged treatment with NSAIDs in animals under stress.

Key words: Gastroprotector, *Atriplex undulata*, NSAIDs, Antiulcerogenic

Fecha de recepción de artículo original: 08-10-2019

Fecha de aceptación para su publicación: 12-12-2019

Introducción

Los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) inhiben las dos isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX). La COX-1 presente en diversos tejidos del organismo interviene en la síntesis de las prostaglandinas (PGs) que poseen funciones citoprotectoras en la mucosa gástrica. Las PGs desempeñan un papel importante en la etiopatogenia de las úlceras por estrés o úlceras gástricas agudas⁽¹⁾ siendo esta patología muy común en pacientes sometidos a estrés quirúrgico, traumático o dolor. Estas lesiones ulcerosas comienzan con alteraciones en la barrera de la mucosa gástrica, constituida por moco insoluble y una solución salina basal producida por las células epiteliales que cubren toda la superficie libre del estómago y las criptas⁽²⁾.

Se esperaba que los AINEs selectivos COX-2 como celecoxib y rofecoxib, produjeran efectos antiinflamatorios sin inducir úlceras gástricas. Sin embargo, ensayos clínicos evidenciaron que estos compuestos también producen lesiones gastrointestinales⁽³⁾.

En medicina humana, se utilizan protocolos en pacientes hospitalizados que incluyen la administración profiláctica de antisecretores para prevenir las úlceras por estrés y evitar hemorragias digestivas altas^(4,5). Al mismo tiempo se administran antiinflamatorios como el paracetamol solo o asociado a otros AINEs para prevenir o tratar estados febriles y para proporcionar analgesia^(6,7). Existe controversia sobre la administración rutinaria de este tipo de drogas y aunque algunos autores determinaron que se están sobre utilizando y que es necesario establecer protocolos de tratamiento⁽⁸⁾, se continúan empleando para que no queden desprotegidos los pacientes que requieren de una terapia profiláctica.

El empleo de compuestos antisecretores como los inhibidores de la bomba de protones, a largo plazo también producen efectos colaterales como osteoporosis, infecciones entéricas⁽⁹⁾ y neoplasias gastrointestinales⁽¹⁰⁾, entre otros. Estos efectos indeseables fundamentan la investigación de alternativas terapéuticas.

Teniendo en cuenta que frecuentemente el empleo de AINEs está indicado en pacientes que sufren estrés, en este trabajo se reprodujeron

estas condiciones en ratones utilizando al mismo tiempo dos protocolos de inducción de úlceras descritos por Toso y Skiar^(11,12). No se encontraron referencias bibliográficas sobre ensayos para evaluar la eficacia de protectores gástricos en ratones sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización⁽¹¹⁾ y al mismo tiempo administrados con indometacina⁽¹²⁾ con el objetivo de reproducir los protocolos empleados en pacientes traumatizados o que son sometidos a intervenciones quirúrgicas.

Los extractos vegetales provenientes de algunas plantas, demostraron prevenir la formación de úlceras inducidas por estrés y AINEs como la indometacina⁽¹³⁻¹⁵⁾. Teniendo en cuenta estos resultados, en el presente trabajo se evaluó el efecto gastroprotector de extractos hidroalcohólicos obtenidos de *Atriplex undulata* en ratones BALB/c a los cuales se les indujeron úlceras por estrés más la administración de Indometacina.

Esta planta, conocida con el nombre de “zampa crespá” o “zampa blanca” no sobrepasa generalmente los 70 cm de altura, su follaje es de color ceniza o plateado, las hojas son brevemente pecioladas con lámina aovado-oblongas, con el borde entero o sinuoso. En Argentina, esta especie subarborescente crece principalmente en suelos moderadamente salinos de las áreas del caldenar y monte arbustivo occidental. Se la encuentra también en el sur de la Provincia de Buenos Aires y en la Patagonia⁽¹⁶⁾. Es un forraje natural para el ganado⁽¹⁷⁾, las cenizas de la planta eran utilizadas como lejía y para tratar problemas digestivos por los indios Ranqueles que habitaban la Provincia de la Pampa⁽¹⁸⁾.

Son escasos los estudios fitoquímicos y descripciones sobre el uso medicinal de *Atriplex undulata*. En el Tesoro de Plantas Medicinales de la Biblioteca de la Facultad de Química, Universidad de la República, UdelaR, Uruguay, se describen usos medicinales como astringentes, vulnerarios, digestivos y aperitivos, recomendando beber una taza después de cada comida de una infusión preparada con 15 g de hojas en un litro de agua para obtener efecto digestivo o aperitivo. Con este mismo propósito puede ser usada bajo la forma de tintura⁽¹⁹⁾. En el mismo Tesoro se publican los estudios fitoquímicos⁽²⁰⁾ realizados sobre el aceite esencial obtenido de partes aéreas de la planta, concluyendo que la presencia de p-acetanisole, carvone, vanillin, 4-vinylguaiacol, guaiacol, terpinen-4-ol y alpha-terpineol explicarían la actividad antioxidante observada. Otros autores también encontraron un importante efecto antioxidante en el aceite esencial de *Atriplex undulata*⁽²¹⁾.

Las referencias sobre el uso tradicional de *Atriplex undulata* que le atribuyen propiedades digestivas y como aperitivo, aunque carecen de precisión, fueron utilizadas para iniciar estudios preliminares para determinar la posible presencia de efectos farmacológicos gastroprotectores en ratones administrados con AINEs.

Materiales y métodos

MATERIAL VEGETAL

Recolección e identificación: se utilizaron partes aéreas de *Atriplex undulata* recolectadas en la Provincia de La Pampa. Fueron identificadas por la Cátedra de Botánica de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa. (UNLPam). Un espécimen de referencia fue depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía de la UNLPam (SRFA). El material vegetal fue desecado en estufa de corriente de aire a 40 °C.

Preparación del Extracto Hidroalcohólico: 200 g de partes aéreas de la planta fueron molidas y extraídas con una solución compuesta por agua:etanol (1:1 v/v) durante 24 h (3 x). Los extractos se juntaron y llevaron a sequedad en rotavapor a 60 °C. El residuo se conservó a -18 °C hasta el momento de realizar los ensayos.

Preparación de las dosis de Extracto Hidroalcohólico de *Atriplex undulata*: para diluir los extractos se empleó una solución de Carboximetilcelulasa (Ex). El extracto proveniente de 10 g de partes aéreas desecadas fue diluido en 10 ml de Ex (Z). A cada ratón se le administró 0,5 ml de Z que contiene el extracto proveniente de 0,5 g de partes aéreas desecadas de la planta.

Animales de experimentación: se utilizaron ratones *Mus musculus* BALB/c hembras de 28 – 30 g de peso, provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. Los animales fueron trasladados al laboratorio de experimentación climatizado a una temperatura de 25 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h respectivamente. Fueron colocados en grupos de 10 animales en jaulas de PVC con rejillas de acero inoxidable de 44x28x15 cm que corresponde al largo, ancho y alto respectivamente. Disponiendo de alimento para Rata/Ratón Extrusado “Coooperación” elaborado por la “Asociación de Cooperativas Argentinas C.L.” y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron alojados en jaulas provistas de rejillas, para evitar la coprofagia y sometidos a ayuno 12 h antes de realizar los bioensayos. El Comité de Ciencia y Técnica aprobó el Proyecto de Investigación y el cumplimiento de las normas para uso y cuidado de animales de experimentación. Res. 279/2016 CD –Facultad de Ciencias Veterinarias -UNLPam.

Modelo Experimental: se formaron al azar cuatro grupos de cinco ratones cada uno. El Grupo Testigo (GT) recibió una dosis de 0,5 ml de

Ex por vía oral (VO) con ayuda de una sonda gástrica, el Grupo Control (GCI) 5 mg/kg de indometacina “Fluka BioChemica” vía subcutánea resuspendida en 0,2 ml de una solución de ClNa al 0,9 % , el Grupo Tratado (GTZ) se administró por VO con 0,5 ml de Z y el Grupo Tratado Indometacina (GTZI) con una dosis VO de 0,5 ml de Z y una dosis SC de indometacina preparada de igual forma que la indicada para el GC. Inmediatamente después de los tratamientos los ratones fueron colocados en jaulas de inmovilización y sometidos a estrés por inmersión en agua a una temperatura de 24 °C durante 4 h. Finalizado el período de inducción de estrés, los animales fueron sacrificados con CO₂, se extrajeron los estómagos e insuflaron con solución fisiológica y colocaron en formol al 10 % durante 2 h. Los estómagos se abrieron por la curvatura mayor y fueron fotografiados para medir las lesiones bien definidas que mostraban pérdida de mucosa y hemorragia utilizando un analizador de imágenes⁽¹²⁾ Motic Image Plus 2.0.

Evaluación de resultados: el daño gástrico se estimó midiendo el área ulcerada de cada estómago expresado como la media \pm desvío estándar. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las diferencias entre las medias fueron estimadas por el Test de DUNCAN. Se compararon los GC respecto al GCI, el GC respecto al GTZ y el GCI respecto al GTZI.

Resultado

Tabla N°1. Efecto gastroprotector de extracto hidroalcohólico de *Atriplex undulata* en ratones administrados con indometacina y sometidos a estrés.

Grupos	Medias \pm D.S. (mm ²)	n			
GTZ	0,08 \pm 0,1	5	A		
GTZI	0,33 \pm 0,25	5	A		
GC	0,91 \pm 0,17	5		B	
GCI	1,3 \pm 0,41	5			C

Ref: (GC): Grupo Control, (GCI): Grupo Control Indometacina, (GTZ): Grupo Tratado con Extracto de *Atriplex undulata*, (GTZI): Grupo Indometacina Tratado con Extracto de *Atriplex undulata*. Test de Duncan: letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo GC con respecto al GCI, entre el GC con respecto al GTZ y entre el grupo GCI con respecto al GTZI.

Discusión

Los estómagos de los ratones sometidos a estrés y administrados con indometacina (GCI), mostraron mayor daño gástrico que aquellos que fueron solamente sometidos a estrés (GC) (Tabla 1). Este resultado es consistente con la observación realizada en pacientes humanos en los que la administración de AINEs en forma profiláctica en pacientes que sufren estrés puede ser contraproducente⁽⁸⁾. En el GCI se emplearon dos métodos de inducción al mismo tiempo con la finalidad de reproducir los cuadros clínicos de pacientes que sufren estrés por dolor en procesos inflamatorios, traumáticos o quirúrgicos y son tratados con AINEs. El aumento del daño gástrico en los ratones de este grupo se explica por la acción conjunta de las lesiones erosivas provocadas por el estrés⁽²²⁻²⁴⁾ que se agravan significativamente por la disminución de los factores citoprotectores que estarían mediados por las prostaglandinas⁽²²⁾ (Tabla 1).

El extracto de *Atriplex undulata* redujo el daño gástrico en los ratones del GTZ con respecto a los del GC, evidenciando que previene las úlceras gástricas inducidas por estrés. En los animales pertenecientes al GTZI, el extracto previno las lesiones gástricas con respecto a los del GCI (Tabla 1) exhibiendo también acción gastroprotectora en ratones sometidos a estrés y administrados en forma conjunta con Indometacina. Otros autores concluyeron que en ratas sometidas a estrés, los posibles mecanismos implicados en la respuesta gastroprotectora se producirían por inhibición de la secreción de ácido clorhídrico y la preservación de la barrera mucosa gástrica por aumento de mucus, parcialmente mediado por compuestos sulfhidrilo y PGE2⁽²⁵⁾. Por otro lado, los AINEs como la indometacina, a una dosis que inhibe la producción de prostaglandina, aumentan la motilidad gástrica, lo que resulta en un aumento de la permeabilidad de la mucosa, la infiltración de neutrófilos y la producción oxirradical, produciendo finalmente lesiones gástricas⁽²⁶⁾. Teniendo en cuenta estas referencias y que el mecanismo patogénico del daño gástrico inducido por AINEs y estrés son multifactoriales, serán necesarios otros estudios para determinar los mecanismos implicados en la respuesta gastroprotectora de *Atriplex undulata* en pacientes que sufren estrés durante procesos agudos y son tratados con AINEs.

Conclusiones

El empleo del modelo experimental de inducción de úlceras por estrés más indometacina (GCI) produjo mayor daño gástrico que el modelo de estrés (GC).

La combinación del modelo de estrés más indometacina reproduce la situación clínica de animales bajo estrés tratados con AINEs, resultando adecuado para evaluar la eficacia de nuevos gastroprotectores.

El extracto de *Atriplex undulata* previno significativamente la formación de úlceras gástricas en los ratones sometidos a estrés por hipotermia e inmovilización y sometidos a estrés más indometacina, mostrando un potencial uso profiláctico.

Bibliografía

1. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh GN; Gastrointestinal Toxicity of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Engl J Med.* 1999; 340: 1888-99.
2. Crawford JM. El tracto gastrointestinal. En: Patología estructural y funcional. -1998- 5º edición. (F. J. Schoen, ed.), Ed. McGraw-Hill Interamericana. Getafe (Madrid, España).
3. Langman MJ, Jensen DM, Watson DJ, *et al.* Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA.* 1999; 282: 1929-33.
4. Rivkin K, Lyakhovetskiy A. Treatment of nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Am J Health-SystPharm* 2005; 62 (1): 1159-68.
5. Betancur Jiménez, J. Profilaxis de sangrado digestivo. Revisión bibliográfica. *Rev Colomb Cir.* 2004; 19 (3): 168-173.
6. Blanco E. Tratamiento del dolor agudo. *Semergen.* 2010; 36(7): 392-398.
7. Toms L, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Single dose oral paracetamol (acetaminophen) with codeine for postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009. doi: 10.1002/14651858.CD001547.pub2.
8. Villatoro Martínez A, Carrasco Nieva M, Mactzil Sánchez García T. Uso inapropiado de la terapia antisecretora gástrica en Urgencias. *Archivos de Medicina de Urgencia de México* 2012; 4 (1): 6-12.
9. Bavishi C, Dupont HL. Systematic review: the use of proton pump inhibitors and increased susceptibility to enteric infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34(11-12): 1269-81.
10. Yang YX, Metz DC. Safety of proton pump inhibitor exposure. *Gastroenterology.* 2010; 139(4): 1115-27.
11. Toso RE, Skliar MI. Efecto Citoprotector de Extractos de *Centaurea Solstitialis* sobre lesiones gástricas inducidas por estrés en ratas. *Ciencia Veterinaria.* 1999; 1: 9-14.
12. Toso RE, Skliar MI. Efecto de la indometacina sobre la citoprotección de extractos de *Centaurea solstitialis* contra úlceras gástricas inducidas por estrés en ratones. *Ciencia Veterinaria.* 2000; 2: 16- 20.
13. Koushki M, Farrokhi Yekta R, Amiri-Dashatan N, Dadpay M, Goshadrou F. Therapeutic effects of hydro-alcoholic extract of *Achillea wilhelmsii* C. Koch on indomethacin-induced gastric ulcer in rats: a proteomic and metabolomic approach. *BMC Complement Altern Med.* 2019; 19(1): 205. doi: 10.1186/s12906-019-2623-4.
14. Brito SA, de Almeida CLF, de Santana TI; *et al.* Antiulcer Activity and Potential Mechanism of Action of the Leaves of *Spondias mombin* L. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 1731459. doi: 10.1155/2018/1731459.
15. Sreeja PS, Arunachalam K, Saikumar S, Kasipandi M, Dhivya S, Murugan R, *et al.* Gastroprotective effect and mode of action of methanol extract of *Sphenodesme involu-crata* var. *paniculata* (C.B. Clarke) Munir (Lamiaceae) leaves on experimental gastric ulcer models. *Biomed Pharmacother.* 2018; 97: 1109-1118.
16. Covas G. Apuntes para la Flora de La Pampa. Vol. 1 - 13. Estación Experimental Agropecuaria de INTA, Anguil. Plantas Pampeanas. Fondo Editorial Pampeano, Santa Rosa. 1999.

-
17. Ruiz Leal A. Aportes al inventario de los recursos naturales renovables de la Provincia de Mendoza. Flora Popular Mendocina. Deserta.1972;3: 178-299.
 18. Steibel PE. Nombre y usos de las plantas aplicados por los Indios Ranqueles de La Pampa (Argentina). Rev. Fac. Agronomía. 1977; 9: 1 – 40.
 19. Consell DM. Enciclopedia de plantas que curan. Buenos Aires. Ed. Ediliba. 1987.
 20. Rodriguez SA, Murray AP. Antioxidant activity and chemical composition of essential oil from *Atriplex undulata*. Nat Prod Commun.2010; 5: 1841-1844.
 21. Murugananthan G, Pabbithi SC. Medicinal Plants With Potent Antioxidant Constituents. Int J Pharm Sci Res; 2012. 3: 1268-1273.
 22. Takeuchi K, Amagase K. Roles of Cyclooxygenase, Prostaglandin E2 and EP Receptors in Mucosal Protection and Ulcer Healing in the Gastrointestinal Tract. Curr Pharm Des. 2018;24: 2002 – 2011.
 23. Kimmey MB. NSAID, ulcers, and prostaglandins. J Rheumatol Suppl. 1992; 36: 68-73.
 24. Murakami M, Lam SK, Inada M, Miyake T. Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesion safter hypothermic restraint stress in rats. 1985. Gastroenterology 88: 660-5.
 25. Kim YS, Park HJ, Kim H, Song J, Lee D. Gastroprotective Effects of Paeonia Extract Mixture HT074 against Experimental Gastric Ulcers in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:3546258. doi:10.1155/2019/3546258
 26. Takeuchi K. Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. World J Gastroenterol. 2012;18(18):2147–2160. doi:10.3748/wjg.v18.i18.214.